

機関番号：32689

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390300

研究課題名（和文）動脈管閉鎖の分子機構解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of closure of the ductus arteriosus

研究代表者

南沢 享（MINAMISAWA SUSUMU）

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：40257332

研究成果の概要（和文）：

動脈管は胎生期に主肺動脈と下行大動脈を結ぶバイパス血管であり、通常生後直ちに閉鎖にむかう。動脈管は胎生期には必須の構造物であるが、生後に開存し続ける場合、問題となる。血管収縮による機能的閉鎖に加えて、解剖学的閉鎖が恒久的な閉鎖には必須である。本研究ではプロスタグランジン E2 とその受容体 EP4 刺激を介する動脈管特異的な下流シグナルを同定し、それが血管リモデリングを誘導して、解剖学的閉鎖を促進することを見出した。さらにプロスタグランジン E2 とその受容体 EP4 刺激以外に、T 型カルシウムチャネルからのカルシウム流入や成長ホルモンなど、新たな動脈管の解剖学的閉鎖に関わる因子を見出した。内膜肥厚形成を含め、解剖学的閉鎖の分子機序を明らかにすることによって、従来の血管拡張収縮制御機序に基づく治療法とは異なる、新たな治療法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：

The ductus arteriosus (DA), a fetal arterial connection between the main pulmonary artery and the descending aorta, normally closes immediately after birth. The DA is a normal and essential fetal structure. However, it becomes abnormal if it remains patent after birth. In addition to functional closure of the DA (vasoconstriction), anatomical closure of the DA is essential for the final DA closure. The present study identified that the DA-specific downstream signals via PGE2-EP4 stimulation induced vascular remodeling of the DA to promote anatomical closure. Furthermore, we found that other factors such as calcium influx via T-type calcium channels and growth hormone play a role in vascular remodeling in the DA. Clarifying the molecular mechanism of DA closure will lead to develop a novel therapeutic strategy for patent DA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：(1)発達小児科学 (2)小児循環器学 (3)骨格筋・平滑筋 (4)未熟児・新生児医学 (5)血管病態学 (6)分子生理学 (7)生理活性物質

## 1. 研究開始当初の背景

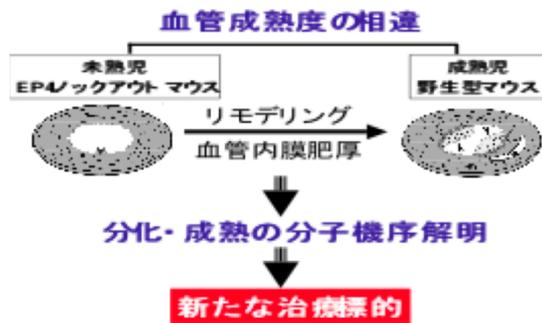
動脈管は肺動脈と大動脈とを連結しているバイパス血管で、胎生期にのみ開存し、生直後の肺呼吸の開始とともに直ちに閉塞にむかう。その閉鎖機転として、まず生直後に血管収縮が惹起され（機能的閉鎖）、引き続き血管組織の構築の変化（リモデリング）が生じることにより、血管内腔面が閉塞し、血流が遮断され、最終的には索状の線維性組織へと変化する（解剖学的閉鎖）。血管リモデリングとして、特に重要なのは血管内膜肥厚であり、他の隣接する血管には認められない構造上の特徴である。この肥厚部位は、いわば内膜面における接着剤の役割を果たし、出生後に収縮性刺激に曝された動脈管は、速やかに恒久的な閉塞へと進むことが出来ると考えられる。一方、未熟児動脈管や先天性動脈管開存症では、この内膜肥厚が乏しいことや、欠除することが知られている。従来の動脈管研究は、血管の収縮弛緩に関する血管作働性物質の検討が中心であり、血管分化の視点から取り組んだ研究は遅れていた。いくつかの研究では、ヒアルロン酸やフィブロネクチンなどの細胞外基質がこの生理的内膜肥厚形成に重要であることが示していたが、これらの細胞外基質を誘導する因子については未解決のままであった。我々は先行研究において、プロスタグランジン E2 (PGE2) が動脈管平滑筋細胞からのヒアルロン酸産生を促し、これが動脈管血管内膜面の肥厚を生じさせ、閉鎖を促進していることを見出した (Yokoyama et al. J Clin Invest 2006)。本発見によって強い動脈管拡張作用を有する PGE2 が、一方では内膜肥厚形成を促進し、血管組織のリモデリングを促し、動脈管の閉鎖に対しても重要な役割を担っていることを示した。本発見により、我々は「動脈管閉鎖遅延は、将来閉塞すべき運命にある血管として、その分化が不完全・未熟であるために発症する」との仮説を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

未熟児、先天性心疾患患児では、動脈管を人為的に閉鎖ないし開存させなくてはならない場合がしばしばある。従来の薬物療法は、PGE の強力な動脈管拡張作用を標的として、開存症に対しては、PGE 合成阻害剤が、閉鎖防止に対しては PGE 1 製剤が、使用されてきた。しかし副作用例や未反応例が少なからず存在するため、動脈管閉鎖の分子機序を解明し、新たな治療法を開発することは、小児医療上、極めて重要な研究課題である。

本研究は「動脈管閉鎖遅延は、将来閉塞すべき運命にある血管として、その分化が不完全・未熟であるために発症する」との仮説（図参照）に基づき、「動脈管の分化・成熟を制御する分子機序を詳細に解明すること」

を目的とした。



## 3. 研究の方法

先行研究において、PGE2-EP4 シグナルが内膜肥厚形成に関わるという新しい働きを見出し、動脈管閉鎖に必須の役割を演じていることを示した。この研究をさらに発展させるために次の実験を行った。

### (1) PGE2-EP4 下流シグナルの詳細な同定と役割の解析

EP4 は G 蛋白受容体として、G $\alpha$  の活性、アデニル酸シクラーゼの活性、cAMP の増加をきたし、PKA を活性化する。また、近年 EPAC と呼ばれる cAMP の下流シグナル分子が活性化され、PKA とは異なる生物活性を有していることが判明している。アデニル酸シクラーゼでは 9 種類、EPAC では 2 種類のアイソフォームが存在することが知られているが、動脈管における役割に関しては殆ど分かっていないため、以下の解析を行った。

- ①. ラット動脈管での経時的発現様式の解析（定量的 RT-PCR 法、Western blot 法など）、
- ②. ラット動脈管平滑筋培養細胞を用いて、各アイソフォームが平滑筋遊走能（Boyden chamber 法）、増殖能（3H-チミジン取り込み試験）、分化マーカーの発現に及ぼす影響を調べた。
- ③. ラット動脈管器官培養法を用いて、各アイソフォームが内膜肥厚に及ぼす影響を検討した。

### (2) PGE2-EP4 シグナル以外の因子が動脈管リモデリングに果たす役割の解析

- ①. 動脈管と大動脈での遺伝子発現パターンの網羅的解析  
ラット胎生 19 日目（未熟段階）と胎生 21 日目（成熟段階）の動脈管と大動脈の組織を取り出し、DNA マイクロアレイ法を用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行った。
- ②. カルシウムが動脈管リモデリングに果たす役割の解析  
T 型カルシウムチャンネルが血管リモデリングに及ぼす影響について実験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) Epac1 が動脈管内膜肥厚の促進因子であることの同定

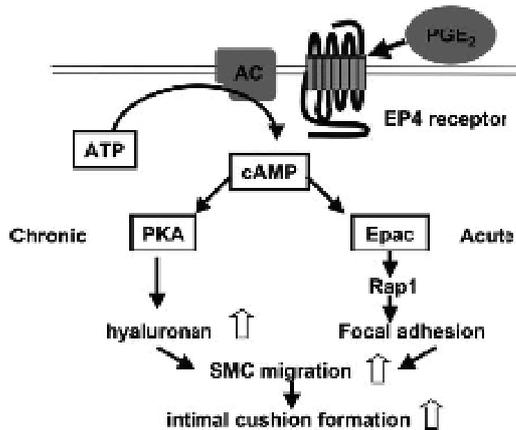
- ①. ラット動脈管において Epac1・Epac2

mRNAs 発現は出生にむけて有意に増加していた。

②.ラット動脈管平滑筋培養細胞を用いた実験で Epac1 が平滑筋細胞遊走を促進することを見出した。

③.ラット動脈管器官培養法を用いて、Epac1 が内膜肥厚を促進することを見出した。

以上の結果から PGE2 シグナルの下流では PKA が慢性的作用として内膜肥厚を形成するのに対し、Epac1 は急性効果として動脈管内膜肥厚形成に働いていることが示唆された（雑誌論文7に詳細を発表）。



(2) アデニル酸シクラーゼ(AC)6型が動脈管内膜肥厚の促進因子であることの同定

①.ラット動脈管では AC2・AC6 mRNAs 発現が有意に高かった。

②.AC6 がヒアルロン酸産生亢進、平滑筋細胞遊走促進、内膜肥厚促進作用があることを見出した。一方、AC2 は AC6 の前述の作用に拮抗する働きがあることを見出した。

③.AC2, AC6 ともに動脈管拡張作用があった。以上の結果から AC2 と AC6 の効果を併せ持つ薬剤では、動脈管リモデリングへの影響が少なく、主に血管拡張作用を有することを明らかにした。これは現在の PGE2 製剤がもつ不利な点を除くことが出来る点で新たな治療薬開発につながる成果であった（雑誌論文2に詳細を発表）。

(3) T型カルシウムチャンネルが動脈管内膜肥厚と血管収縮の促進因子であることの同定

①.ラット動脈管では T型カルシウムチャンネルアイソフォーム中、alpha1G mRNAs 発現が有意に高かった。

②.alpha1G 過剰発現によって、動脈管では平滑筋細胞遊走促進、内膜肥厚促進作用がみられ、T型カルシウムチャンネル阻害剤によって、内膜肥厚形成は阻害された。

③. T型カルシウムチャンネル選択的阻害剤は新生児の動脈管閉鎖を有意に遅らせた。

以上の結果から、T型カルシウムチャンネル選

択的阻害剤は PGE 製剤に代わる新たな動脈管開存維持のための薬剤になる可能性が示唆された（雑誌論文5に詳細を発表）。

(4) 成長ホルモンが動脈管内膜肥厚の促進因子であることの同定

①.DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析の結果、ラット動脈管では成長ホルモン受容体 mRNAs 発現が有意に高かった。

②. 成長ホルモン刺激によって、動脈管では平滑筋細胞遊走促進、内膜肥厚促進作用がみられた。

③. 成長ホルモン刺激は筋原線維や細胞骨格構成遺伝子発現に影響を与えることが示された。

本研究によって、胎生期での成長ホルモンが動脈管リモデリングに及ぼす役割を明らかにした。また、網羅的遺伝子解析の結果、成長ホルモン受容体以外にもラット動脈管で特異的に発現する遺伝子を同定することができた（雑誌論文1に詳細を発表）。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

1. Jin MH, Yokoyama U, Sato Y, Shioda A, Jiao Q, Ishikawa Y, Minamisawa S (correspondence). DNA microarray profiling identified a new role of growth hormone in vascular remodeling of rat ductus arteriosus. *J Physiol Sci.* 61(3):167-79, 2011.(査読有)
2. Yokoyama U, Minamisawa S (correspondence), Katayama A, Tang T, Suzuki S, Iwatsubo K, Iwasaki S, Kurotani R, Okumura S, Sato M, Yokota S, Hammond HK, Ishikawa Y. Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. *Circ Res* 106 (12): 1882-92, 2010. (査読有)
3. Yokoyama U, Minamisawa S, Ishikawa Y. Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus. *J Smooth Muscle Res.* 46 (2): 77-87, 2010. (査読有)
4. 横山詩子, 南沢享, 中澤誠. 出生に関わる循環アダプテーション③動脈管の分子生物学. *Fetal & Neonatal Medicine* 2 (2): 12-15, 2010.
5. Akaike T, Jin MH, Yokoyama U, Izumi-Nakaseko H, Jiao Q, Iwasaki S, Iwamoto M, Nishimaki S, Sato M, Yokota S, Kamiya Y, Adachi-Akahane S, Ishikawa Y, Minamisawa S (correspondence). T-type Ca<sup>2+</sup> channels promote oxygenation-induced closure of the rat ductus arteriosus not only by

vasoconstriction but also by neointima formation. *J Biol Chem.* 284(36):24025-34, 2009. (査読有)

6. Yokoyama U, Minamisawa S (correspondence), Quan H, Akaike T, Jin M, Otsu K, Ulucan C, Wang X, Baljinniyam E, Takaoka M, Sata M, Ishikawa Y. Epac1 is upregulated during neointima formation and promotes vascular smooth muscle cell migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295(4):H1547-55, 2008. (査読有)
7. Yokoyama U, Minamisawa S (correspondence), Quan H, Akaike T, Suzuki S, Jin M, Jiao Q, Watanabe M, Otsu K, Iwasaki S, Nishimaki S, Sato M, Ishikawa Y. PGE2-activated Epac promotes neointimal cushion formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of PKA. *J Biol Chem.* 1283 (42): 28702-9, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 46 件)

1. Minamisawa S. A comprehensive approach to understand the formation of the cardiovascular network (Overview). The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)
2. Liu N, et al. Successful isolation of vascular endothelial cells from the rat ductus arteriosus. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)
3. Aida T, et al. Thromboxane A2 receptor stimulation specifically causes closure of the rat ductus arteriosus. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)
4. Kato Y, et al. Epac1 promotes vascular remodeling upon vascular injury in vivo. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)
5. Ishiwata R, et al. Serum depletion and three-dimensional multilayer composition induce elastic fiber formation and a contractile phenotype of rat vascular smooth muscle cells. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)
6. Yokoyama U, et al. Regulation of vascular remodeling of the ductus arteriosus. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)
7. Yokota T, et al. Thromboxane A2 Receptor Stimulation Induces Closure of the Rat Ductus Arteriosus. The 5th Global COE International Symposium on 'Practical Chemical Wisdom' (2011.1.13-14, Waseda University, Tokyo)
8. 南沢 享. プロスタグランジン E の新たな作用—動脈管リモデリングへの多面的関与: 第 8 回京都心血管代謝セミナー. 京都、杉浦ホール、2010 年 6 月 4 日.
9. Minamisawa S, et al. Oxygenation promotes migration of smooth muscle cell in the rat ductus arteriosus. Developmental Vascular Biology Workshop IV – February 10-13, 2010 at the Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, Monterey, California.
10. Minamisawa S, et al. Counteracting regulation of vascular remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. The 16th International Vascular Biology Meeting (2010.6.20-24, Los Angeles)
11. Yokota T, et al. A Role of Thromboxane A2 receptor in the rat ductus arteriosus as a vasoconstrictor. The 16th International Vascular Biology Meeting (2010.6.20-24, Los Angeles)
12. Yokoyama U, et al. Prostaglandin EP4 signaling negatively regulates vascular elastic fiber assembly. The 84th Scientific Session, American Heart Association (AHA) (2010.11.13-11.17, Chicago, USA)
13. 岩崎志穂、他「ラット動脈管内膜肥厚におけるアデニル酸シクラーゼアイソフォームの役割の検討」第 46 回日本周産新生児医学会 (2010.7.11-13 神戸)
14. Shioda A, et al. Prostaglandin EP4 Signaling Negatively Regulates Vascular Elastic Fiber Assembly. The 33th Annual Meeting of the Molecular Biological Society of Japan (2010.12.7-10, Kobe)
15. 南沢 享, 横山 詩子. 動脈管閉鎖の分子機序: プロスタグランジンの予期せぬ役割. (ワークショップ: 1W15 心臓大血管形成における器官形成メカニズムの普遍性と独自性): 第 32 回日本分子生物学会. 横浜、2009 年 12 月 9-12 日.
16. Minamisawa S, et al. Oxygenation promotes smooth muscle cell migration in the rat ductus arteriosus. BCVS Conference-Molecular Mechanisms of Cardiovascular Diseases. Lake Las Vegas, Nevada. July 20-23, 2009.
17. Yokoyama U, et al. Adenylyl cyclase type6, but not type2 and 5, selectively promotes cAMP-dependent vascular remodeling in rat ductus arteriosus. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2009.3.20-22, Osaka.
18. 塩田 亜樹、他. プロスタグランジン E 受容体 EP4 シグナルによる弾性線維 (エラスチン) 形成の制御. 心臓血管発生研究会 2009.7.24-25 福島
19. 青木理加、他. 胎生後期ラット動脈管における TRPM チャネルの発現. 心臓血管発生研究会 2009.7.24-25 福島
20. 青木理加、他. ラット動脈管組織における

- TRPM チャネルの発現～発達段階での大動脈組織との比較検討. 第 13 回 Molecular Cardiovascular Conference. 北海道、2009 年 9 月 4-6 日
21. 横山 詩子, 他. プロスタグランジン E 受容体 EP4 シグナルによる弾性線維形成の制御 第 13 回 Molecular Cardiovascular Conference. 北海道、2009 年 9 月 4-6 日.
  22. 片山綾子, 他. ラット動脈管における6型アデニル酸シクラーゼの内膜肥厚形成作用. 第 13 回 Molecular Cardiovascular Conference. 北海道、2009 年 9 月 4-6 日
  23. 小澤 基, 他. ラット動脈管において酸素化は平滑筋細胞遊走を促進する. 第 13 回 Molecular Cardiovascular Conference. 北海道、2009 年 9 月 4-6 日.
  24. 南沢享, 他. 血管閉鎖を制御する因子の同定と新治療法開発. 第1回成果報告シンポジウム「早稲田大学が目指す新しい医・理・工学融合研究の展開」東京 TWIns, 2009 年 8 月 20 日.
  25. Katayama A, et al. Adenylyl cyclase type 2 and 6 differentially promote vascular tone and remodeling in the ductus arteriosus. 36th International Congress of Physiological Sciences. Kyoto. July 31. 2009.
  26. Ozawa M, et al. Oxygen Promoters Calcium-dependent Smooth Muscle Cell Migration in the Rat Ductus Arteriosus. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences. Kyoto International Conference Center, July 27th, 2009.
  27. Yokota T, et al. T-type calcium channels regulate smooth muscle cell migration, neointimal formation, and oxygen-induced closure in rat ductus arteriosus. The 1st international Symposium on Biomedical Science and Engineering Waseda University High-Tech Research Center. TWIns, Tokyo, July 18th, 2009.
  28. Minamisawa S, et al. Oxygenation from hypoxia to normoxia promotes smooth muscle cell migration in the rat ductus arteriosus. The 26th Annual Meeting of the Japanese Section. Sapporo, Hokkaido University. 12/5/2009.
  29. Minamisawa S, c-AMP dependent intimal cushion formation of the rat ductus arteriosus. The 4th Joint Scientific Symposium University of Bonn and Waseda University. Tokyo, Feb. 26th, 2008.
  30. Minamisawa S, Prostaglandin E2 in the Ductus Arteriosus: A New Role for an Old Friend. CNSI-ASMeW Joint Symposium on Nano-scale Research into Biosensors, Biomaterials, and Nanotoxicology. Los Angels, USA, March. 6th, 2008.
  42. Congress of Asian Society for Pediatric
  31. 南沢 享 Prostaglandin E-cAMP signals promote neointimal cushion formation in the ductus arteriosus. 第85回日本生理学会大会, 東京, 2008年3月27日.
  32. 南沢 享 構造変化から見た動脈管閉鎖機構. 第7回心臓血管発生研究会、磐梯熱海温泉 ホテル 華の湯, 2008年7月5日.
  33. 南沢 享. プロスタグランジンによる血管内膜肥厚:A new role for an old friend. 岩手医科大学先端医療研究センター公開シンポジウム「バイオイメージングと分子生物学による脳・血管解明—健康増進に向けた最先端研究」盛岡・岩手県医師会館、2008年7月19日.
  34. Minamisawa S, et al. Identification of regulatory factors and innovation of novel therapeutic strategy for neointimal thickening of arteries. ASMeW International Symposium. “Realizing High Quality of Life and Extension of Health Life Expectancy” Waseda International Conference Center, Tokyo, August 27-28, 2008.
  35. Minamisawa S, Animal model of ductus arteriosus: A new role of prostaglandin E. 2008Pediatric Research Workshop 「What Animal Model Can Do in Pediatric Research」 by Taiwan Pediatric Association. Taipei, September. 13th, 2008.
  36. Minamisawa S, Molecular mechanisms of neointimal thickening: A new role of prostaglandins, Taipei・Institute of Biomedical Science in Academia Sinica, 9/15/2008.
  37. Minamisawa S, Molecular mechanisms of anatomical closure of ductus arteriosus. Taipei・Buddhist Tzu Chi General Hospital, 9/16/2008.
  38. Minamisawa S, et al. EPAC promotes pathophysiological neointima formation in rodent artery. Experimental Biology 2008. San Diego, USA, 4/8/2008.
  39. Akaike T, et al. Blockade of T-type calcium channels attenuates smooth muscle cell migration, neointimal formation, and oxygen-induced vascular contraction in rat ductus arteriosus. China-Korea-Japan Pediatric Heart Forum 2008, Fukushima, July 2008.
  40. Akaike T, et al. Blockade of T-type calcium channels attenuates smooth muscle cell migration, neointimal formation, and oxygen-induced vascular contraction in rat ductus arteriosus. Pediatric Academic Societies and The 4th Congress of Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting. Honolulu, Hawaii, USA, May 2008
  41. Akaike T, et al. PGE2-activated EPAC promotes neointimal cushion formation of the rat ductus arteriosus in a distinct way of PKA. Pediatric Academic Societies and The 4th Research Joint Meeting. Honolulu, Hawaii,

USA, May 2008

43. 赤池 徹, 他. ラット動脈管における酸素濃度の上昇と平滑筋細胞遊走能の関連の検討. 第111回日本小児科学会学術総会, 2008年4月東京.
44. Akaike T, et al. T-type calcium channels regulate smooth muscle cell migration, neointimal formation, and oxygen-induced vascular contraction in rat ductus arteriosus. Experimental Biology 2008. San Diego, CA, USA, April 2008
45. 赤池 徹, 他. Rising oxygen tension promoted smooth muscle cell migration in the rat ductus arteriosus. 第72回日本循環器学会総会, 2008年3月福岡. ポスター発表
46. 赤池 徹, 他. 第85回日本生理学会大会, 2008年3月東京. ポスター発表

[その他]

ホームページ等

<http://web.mac.com/sminamisawa/set/Welcome.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

南沢 享 (Minamisawa Susumu)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：40257332